

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局(43) 国際公開日
2003 年 10 月 2 日 (02.10.2003)

PCT

(10) 国際公開番号
WO 03/080063 A1(51) 国際特許分類: A61K 31/519, A61P
9/00, 9/10, 9/12, 43/00 // C07D 475/04PHARMA CO., LTD.) [JP/JP]; 〒102-0083 東京都千代
田区麹町 5 丁目 7 番地 2 Tokyo (JP).

(21) 国際出願番号: PCT/JP03/03428

(72) 発明者; および

(22) 国際出願日: 2003 年 3 月 20 日 (20.03.2003)

(75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 川嶋 成乃亮
(KAWASHIMA, Seinosuke) [JP/JP]; 〒560-0002 大阪
府豊中市緑丘 3 丁目 9-1 1 Osaka (JP). 横山 光宏
(YOKOYAMA, Mitsuhiro) [JP/JP]; 〒651-1112 兵庫県
神戸市北区鈴蘭台東町 9 丁目 1 1-2 9 Hyogo (JP).

(25) 国際出願の言語: 日本語

(26) 国際公開の言語: 日本語

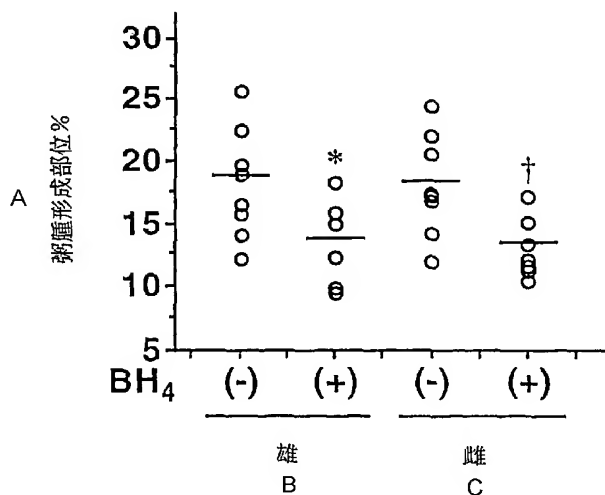
(30) 優先権データ:
特願 2002-82159 2002 年 3 月 22 日 (22.03.2002) JP(74) 代理人: 社本 一夫, 外 (SHAMOTO, Ichio et al.); 〒
100-0004 東京都千代田区大手町二丁目 2 番 1 号 新大
手町ビル 206 区 ユアサハラ法律特許事務所 Tokyo
(JP).(71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): 第一
サントリーファーマ株式会社 (DAIICHI SUNTORY

(81) 指定国 (国内): BR, CA, CN, KR, US.

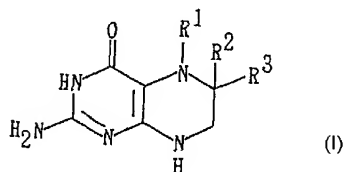
[続葉有]

(54) Title: PREVENTIVES OR REMEDIES FOR DISEASES CAUSED BY eNOS EXPRESSION

(54) 発明の名称: eNOS 発現に起因する疾患の予防または治療薬



(57) Abstract: To treat or prevent diseases and pathological conditions caused by the failure of an eNOS gene expression product to exert the function inherent to eNOS, it is intended to provide remedies of activating eNOS so as to its optimum function while having a high safety without any side effects. More specifically, drugs for treating or preventing diseases and pathological conditions caused by an increase in eNOS which comprise as the active ingredient the compounds represented by the following general formula or pharmaceutically acceptable salts thereof: (I) wherein R¹ and R² represent each hydrogen, or R¹ and R² together form a single bond; R³ represents -CH(OH)CH(OH)CH₃, -CH(OCOCH₃)CH(OCOCH₃)CH₃, -CH₃, -CH₂OH or phenyl provided that R¹ and R² each represents hydrogen, or R³ represents -COCH(OH)CH₃ provided that R¹ and R² together form a single bond.



A...LESION AREA
B...MALE
C...FEMALE

[続葉有]

WO 03/080063 A1



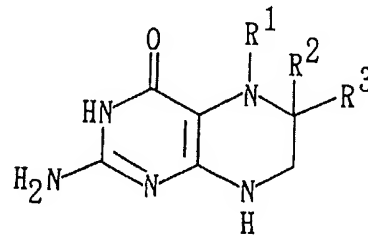
(84) 指定国 (広域): ヨーロッパ特許 (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IT, LU, MC, NL, PT, RO, SE, SI, SK, TR).

2文字コード及び他の略語については、定期発行される各PCTガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語のガイダンスノート」を参照。

添付公開書類:
— 国際調査報告書

(57) 要約:

本発明は、eNOS 遺伝子の発現産物が、eNOS 本来の機能を果たさないことに起因する疾患・病態を治療または予防するために、eNOS を最適に機能させるよう賦活化する、副作用がなく安全な治療剤を提供する。より具体的には、本発明は式 (I) :



[式中、R¹ および R² は、それぞれ水素原子を表すか、または一緒になって単結合を表し、R¹ および R² が水素原子を表す場合には、R³ は -CH(OH)CH(OH)CH₃、-CH(OCOCH₃)CH(OCOCH₃)CH₃、-CH₃、-CH₂OH 又はフェニル基を表し、R¹ および R² が一緒になって単結合を表す場合には、R³ は -COCH(OH)CH₃ を表す] で表される化合物またはその薬学的に許容される塩を有効成分とする、eNOS 増加に起因する疾患・病態を治療または予防するための薬剤である。

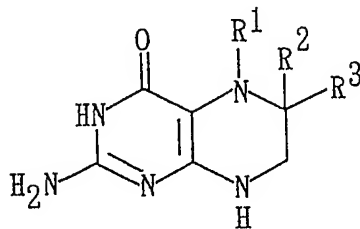
明 細 書

e N O S 発現に起因する疾患の予防または治療薬

5 技術分野

本発明は 式 (I) :

10



15

(式中、各記号は下記に定義するとおりである) で表される化合物又はその薬学的に許容される塩を有効成分とする、eNOS 増加が関与する疾患・病態に対して、あるいは eNOS 蛋白量、NO 産生が過剰または十分であるにもかかわらずその病態が進展することに対して、その進展を抑制しあるいは回復させ、あるいは eNOS の本来の機能活性の回復により疾患・病態の治療効果を促進させることにより、有効に予防または改善する薬剤に関する。

背景技術

20

血管内皮は血管トーンスや血栓の形成に重要な役割を果たす場であることは知られていたが、1980年に初めて内皮由来弛緩因子 (endothelium-derived relaxing factor: EDRF) の存在が報告された。その後、1987年に EDRF の本体が一酸化窒素 (NO) であることが証明された。NO は、L-アルギニンが酸化され、NG-ヒドロキシ-L-アルギニンから L-シトルリンになる際に産生され、その反応は NO 合成酵素 (NO synthase: NOS) という酵素によって触媒される。なお、NOS は、血管内皮、神経系、腎臓、血小板、心筋、平滑筋など幅広く存在し、産生される NO は、極めて多彩な作用を有するため、全身の循環調節において重要な

25

役割を果たす。

また、NOSについてはその遺伝子がクローニングされ、構造解析が行われた。その結果、NOSには補酵素として、カルモジュリン (CaM)、フラビン、NADPHの結合部位に加えて、本発明の有効成分である式 (I) の化合物に含まれる、(6R)-L-エリスロー5, 6, 7, 8-テトラヒドロビオプテリン (以下、「BH4」という) の結合部位が存在することが判明した。さらに、BH4が実際にNOSの機能制御に関与することも示唆されている。つまり、NOSはBH4存在下で、2量体 (Coupling) となることによりNOの産生が可能となることが示されている (血管 2001: 24(2) 63-67)。これまで、特開平 10-338637 ではNOSの機能低下に起因する疾患に対し、特開平 11-246410 ではインスリン抵抗性が関与する血管機能異常を伴う疾患に対し、W099/43324 では薬剤性腎症に対して、それぞれBH4がNOSの機能を賦活することによりそのような疾患に対する予防あるいは治療効果を有することが記載されている。

このように動脈硬化、高脂血症、心不全、高血圧、糖尿病など種々の疾患で内皮依存性血管拡張反応が減弱しており、NOはこれらの疾患における心筋虚血の発現、運動耐容能の低下などの改善に関係することが明らかとなった。また、NOはその多彩な作用により、血管構築の維持、さらには血管リモデリングにも深く関わっていることが明らかになってきた。生体内では抗動脈硬化因子として働いている可能性が示唆されてきた。たとえば動脈硬化モデルの内皮型NO合成酵素 (eNOS) 遺伝子欠損マウス (ApoE-KO/eNOS-KO) ではNO産生も乏しく動脈硬化が更に促進されるとの報告がある。(Kuhlencordt PJ ら: Accelerated Atherosclerosis, Aortic Aneurysm Formation, and Ischemic Heart Disease in Apolipoprotein E/Endothelial Nitric Oxide Synthase Double-Knockout Mice. Circulation 2001;104:448-454)。

ところが、一方において、ApoE-KO/eNOS-Tg (eNOS 過剰発現マウス) では動脈硬化は更に促進されることが明らかになった (米国心臓病会議 2001 年 11 月 16 日、抄録 No.1312, Overexpression of Endothelial Nitric Oxide Synthase Accelerates Atherosclerotic Lesion Development in ApoE-Deficient Mice)。

また、遺伝性高脂血症（WHHL）家兎の動脈硬化血管の内皮細胞 cNOS（構成的 NO 合成酵素）の mRNA および蛋白レベルの発現は低下しておらず、むしろ増強していることが認められ、動脈硬化血管における内皮依存性血管弛緩反応の低下の機序は NOS 自体の減少によるものではないとも考えられた（NO と病態/治療、36 ページ、1995、川嶋）。さらに、動脈硬化血管では内皮依存性血管弛緩反応が低下しているものの、NO の産生は増加しているとの報告もあり（Harrison ら：JCI 86:2109-2116, 1990）、eNOS の増加と NO の関係および eNOS 増加と病態との関係は解明されていない。

また、高脂血症治療薬のスタチン系薬剤（Laufs U ら：Upregulation of endothelial nitric oxide synthase by HMG Co A reductase inhibitors. Circulation 1998 ; 97: 1129-1135）、高血圧、心不全の治療薬の ACE 阻害薬、AT1 拮抗薬（Onozato ML ら：Oxidative stress and nitric oxide synthase in rat diabetic nephropathy: Effect of ACEI and ARB. Kidney Int. 2002; 61:186-194）、Ca 拮抗薬（Ding Y ら：Nifedipine and diltiazem but not verapamil up-regulate endothelial nitric oxide synthase expression. J Pharmacol Exp Ther. 2000;292:606-609）などでは、eNOS 遺伝子の発現を増加させあるいは eNOS mRNA を安定化させることなどにより eNOS を増加させている。これらの薬剤は、スタチン系薬剤では 3-ヒドロキシ-3-メチルグルタリル-CoA（HMG-CoA）を阻害すること、ACE 阻害薬ではアンジオテンシン変換酵素を阻害すること、AT1 拮抗薬はアンジオテンシン受容体に拮抗すること、Ca 拮抗薬は Ca チャンネルでの Ca イオンの細胞流入を抑制することでこれらの医薬品それぞれの薬効を示すものであり、eNOS 遺伝子発現の増加あるいは eNOS mRNA の安定化による eNOS 増加により、これらの医薬品の適応となる疾患・病態に対する薬効をもつものではない。

近年 eNOS 遺伝子を生体内に導入し血管内の NO 産生能を回復あるいは増加させようという試みがなされている。Channon らは兎に eNOS あるいは nNOS 遺伝子を導入することにより動脈硬化血管に NO による血管拡張作用が発現することを示した（Channon et al. Circulation 98:1905-1911, 1998）。また Qian らは高コ

レステロール食で飼育した兎に eNOS 遺伝子を導入することにより頸動脈血管の細胞接着因子の発現および炎症細胞浸潤が減少することを示した (Qian et al. Circulation 99:2979-2982, 1999)。しかしこれらの知見は短期でしかも局所的な効果を見ているに過ぎず、長期的な効果および全身に及ぼす効果についての検討はなされていないとの批判もある。eNOS 遺伝子の過剰発現により動脈硬化を更に悪化させるという Kawashima らの知見 (米国心臓病会議 2001 年 11 月 16 日、抄録 No.1312) は eNOS 遺伝子の長期発現あるいは局所的な過剰発現により eNOS 遺伝子治療による効果を期待した疾患をさらに悪化させる可能性も否定できないことを示している。

10

発明の概要

本発明の課題は、eNOS 遺伝子の発現産物が、eNOS 本来の機能を果たさないことに起因する疾患・病態を治療または予防するために、増加した eNOS の機能を賦活化する副作用がなく安全な治療剤を提供することである。

15

本発明の別の課題は、医薬品の投与によりまたは遺伝子治療により、eNOS 遺伝子を発現させあるいは発現を増加させあるいは eNOS mRNA を安定化させることなどにより eNOS を増加させて種々の疾患を治療する方法における補助薬として、発現しまたは発現が増大した eNOS の機能を賦活化する、副作用がなく安全な治療剤を提供することである。

20

本発明の別の課題は、eNOS 遺伝子を発現させることあるいは発現を増加させることにより種々の疾患を治療する方法において、その発現もしくは発現増加による治療効果を長期間および／または持続的に得るための補助薬として、増加した eNOS の機能を賦活化する、副作用がなく安全な治療剤を提供することである。

25

つまり、本発明は、eNOS が本来の機能を果たさないことに起因する疾患・病態に対して、あるいは eNOS 蛋白量が過剰である場合に、またはその量が十分であるにもかかわらず、その病態が進展することに対して、あるいは eNOS を増加させることによる疾患・病態の治療に対して eNOS の NO 産生機能を良好な状態に保つことにより、有効に予防または改善することにより、患者の日常生活の質を

高めるべく、副作用がなく安全な治療剤を提供することを目的とする。

図面の簡単な説明

5 図 1 は、eNOS トランスジェニック ApoE 欠損マウス (ApoE-KO/eNOS-Tg) における eNOS の過剰発現を示すグラフである。

図 2 は、ApoE-KO/eNOS-Tg マウスにおいて粥腫部位が拡大したことを示すグラフである。

図 3 は、BH4 投与により、ApoE-KO/eNOS-Tg マウスの粥状部位が縮小したことを示すグラフである。

10 図 4 は、BH4 投与により、高コレステロール食で飼育した ApoE-KO/eNOS-Tg マウスにおける plaque 部位のスーパーオキシド産生が減少したことを示すグラフである。

図 5 は、BH4 投与により、ApoE-KO/eNOS-Tg マウスにおいて NO 産生が有意に増加したことを示すグラフである。

15

発明の開示

eNOS は NO を産生させることにより生体内の各種調整を行っているが、本発明者らは、eNOS の発現は NO 濃度や活性酸素濃度などが生体にとって良好な状態を保持するように調整することが必要であり、良好な状態が破綻した場合は eNOS
20 本来の酵素作用が十分に得られないか、得られたとしても、生体内の活性酸素も増大し、治療すべき病気を悪化させたり新たな疾患を生じせしめることを見いだした。つまり、eNOS 遺伝子発現、NO 産生ともに過剰または十分であるにもかかわらず疾患・病態（例えば動脈硬化）を悪化させる状況においては、同時に活性酸素の産生も過剰な状況であることを見いだした。

25 このような疾患の治療および／または予防手段として、NOS は uncoupling (2 量体になってない) 状態のときは活性酸素を産生することに着目した。そして、coupling (2 量体形成) 反応に関与している最も重要な因子としての BH4 がこの状態を解決する可能性がある物質ではないかとの仮説をたてた。すなわち eNOS

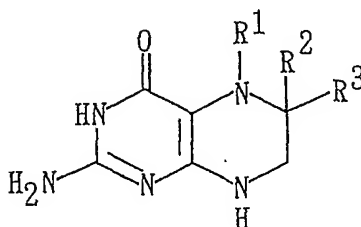
遺伝子が過剰発現あるいは付加発現あるいは eNOS mRNA が安定化されることなどにより eNOS が増加した状態では BH₄ の供給が間に合わない状態、つまり BH₄ の量が不足状態になることにより、NOS は uncoupling となり活性酸素を発生させていると考えられることから、BH₄ を投与することにより eNOS の機能を正常化

5 させればよいであろうと考えた。

そこで、鋭意検討を重ねた結果、驚くべきことに eNOS 遺伝子過剰発現に起因する動脈硬化、血管粥腫の動物実験モデルにおいて、BH₄ 投与により、これらの疾患の進行が抑制されることを認め、BH₄ が増加した eNOS の機能を賦活化して、eNOS 増加に起因する疾患・病態に対し、治療および予防する効果を見出し、本

10 発明に至った。

従って本発明は、式 (I) :



[式中、R¹ および R² は、それぞれ水素原子を表すか、または一緒になって単結合を表し、R¹ および R² が水素原子を表す場合には、R³ は -CH(OH)CH(OH)CH₃、-CH(OCOCH₃)CH(OCOCH₃)CH₃、-CH₃、-CH₂OH 又はフェニル基を表し、R¹ および R² が一緒になって単結合を表す場合には、R³ は -COCH(OH)CH₃ を表す] で表される化合物またはその薬学的に許容される塩を有効成分とする、eNOS 増加に起因する疾患・病態を治療または予防するための薬剤である。

eNOS 増加により eNOS が本来の機能を果たさないことに起因する疾患・病態には、1) eNOS 遺伝子発現の異常により eNOS が過剰発現し、生じる疾患・病態、2) eNOS 遺伝子を外部から導入して遺伝子治療を行う場合 (例えば、心血管系の疾患や動脈硬化の治療) に、eNOS が過剰発現したり、発現した eNOS が本来の機能を発揮しないために、治療効果が得られなかったり、却って病状が悪化する

場合、3)さらに、スタチン系薬剤、ACE 阻害薬、AT1 拮抗薬、Ca 拮抗薬などの投与により増加した eNOS が本来の機能を発揮しないために、治療効果が得られなかったり、却って病状が悪化する場合、等を含む。

本発明の薬剤は、BH4 をこのような eNOS 増加により eNOS が本来の機能を発揮していない状態または、eNOS 遺伝子が過剰発現した状態、またはそのような状態を生じることが予測される場合において、治療的または予防的に投与するため、または eNOS 遺伝子導入に併用投与するための有効な治療剤である。遺伝子導入との併用投与は、遺伝子導入の前、ほぼ同時、または後のいずれに行うことも可能である。遺伝子導入後、長期間投与を続けてもよい。

本発明の薬剤を必要とする eNOS 増加により eNOS が本来の機能を発揮していない状態または、eNOS 遺伝子が過剰発現した状態は、例えば、心血管系の疾患、動脈硬化、肺高血圧などとして顕在する。そのような疾患において、生体内で eNOS が過剰発現していることあるいは正常に機能していないことを診断するには、組織（例えば血管組織）中の活性酸素の量を組織化学的に調べることができる。

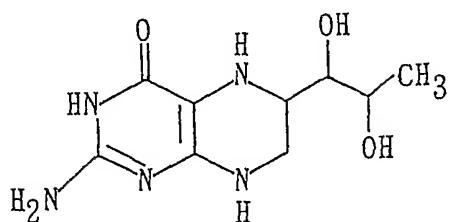
スタチン系薬剤、ACE 阻害薬、AT1 拮抗薬、Ca 拮抗薬などの eNOS の増加があるとされる薬剤と併用投与するためには、それらの薬剤の投与前、投与中、投与後に本発明の薬剤を投与してもよく、またはそれらの薬剤との合剤として本発明の薬剤を投与してもよい。例えばスタチン系薬剤ではアトロバスタチン、フラバスタチン、シンバスタチン、メバスタチン等、ACE 阻害薬はアラセプリル、イミダプリル、エラナプリル、カプトプリル、キナプリル、トランドプリル、ペリンドプリル、ラミプリル等、AT1 拮抗薬はロサルタン等、Ca 拮抗薬ではニフェジピン、ジルチアゼム等の薬剤はそれぞれ、動脈硬化、高脂血症、あるいは高血圧、心不全、虚血性心疾患の血管リモデリングの抑制、糖尿病腎症の治療に用いられている。

本発明の治療剤の有効成分である式 (I) の化合物は公知化合物であり、悪性高フェニルアラニン血症、うつ病、パーキンソン病、その他の治療薬としての用途が知られている。例えば、特開昭 59-25323 号公報、同 59-7608

6号公報、同61-277618号公報、同63-267781号公報を参照。
 これらは適当な塩として用いてもよく、そのような塩としては薬理的に無毒性の
 酸、例えば、塩酸、リン酸、硫酸、ホウ酸等の鉱酸、及び、酢酸、ギ酸、マレイ
 ン酸、フマル酸、メシル酸等の有機酸との塩が例示される。

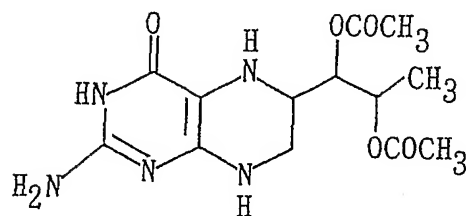
- 5 本発明の有効成分である式(I)で表される具体的化合物には次のものおよび
 それらの薬学的に許容される塩が含まれる：

(6R)-L-エリスロー5, 6, 7, 8-テトラヒドロピオプテリン (BH
 4)

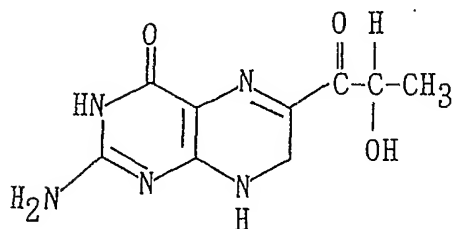


(6R, S)-5, 6, 7, 8-テトラヒドロピオプテリン

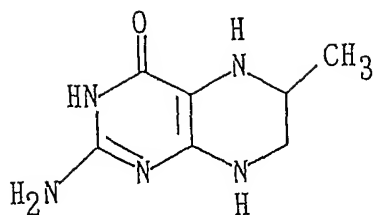
1', 2'-ジアセチル-5, 6, 7, 8-テトラヒドロピオプテリン



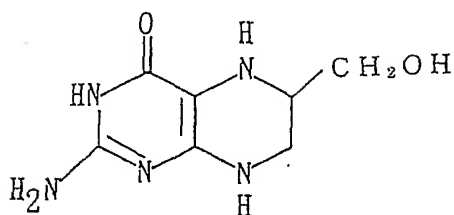
セピアプテリン



6-メチル-5, 6, 7, 8-テトラヒドロピオプテリン

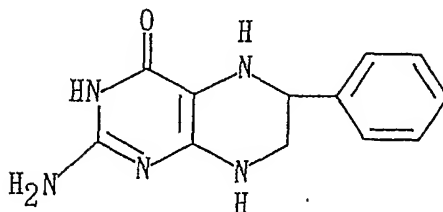


5 6-ヒドロキシメチルー5, 6, 7, 8-テトラヒドロプテリン



10

6-フェニルー5, 6, 7, 8-テトラヒドロプテリン



15

以上の化合物で、好ましい化合物は5, 6, 7, 8-テトラヒドロピオプテリン類又はその塩であり、更にそのうちでも最も好ましい化合物はBH4又はその塩である。

20 本発明の治療剤は、式(I)で表される化合物を一般の医薬製剤に用いられる担体と、常法によって経口、直腸又は非経腸(静脈内、髄液中への投与を含む)投与に適する製剤形態にすることにより製造される。

これら医薬製剤に用いられる担体としては、用いられる剤形によるが、一般的に賦形剤、結合剤、崩壊剤などが挙げられる。

25 賦形剤の代表的な例としては澱粉、乳糖、白糖、ブドウ糖、マンニトール、セルロース等があり、結合剤としてはポリビニルピロリドン、澱粉、白糖、ヒドロキシプロピルセルロース、アラビアゴムなどがある。又、崩壊剤の例としてはデンプン、寒天、ゼラチン末、セルロース、CMCなどがあるが、一般に用いられ

ている賦形剤、結合剤、崩壊剤であればこれら以外でもよい。

本発明の治療剤は、好ましくは上記担体以外に、有効成分を安定化するための酸化防止剤を含有する。酸化防止剤は医薬製剤に一般に使用されているものから適宜選択され、例えば、アスコルビン酸、N-アセチルシステイン、L-システイン、d1- α -トコフェロール、天然トコフェロール等があげられる。使用する量は、活性成分（1種またはそれ以上）を安定化させる量であればよいが、一般的には活性成分1に対し重量で0.2ないし2.0が好ましい。

経口投与に適する本発明の製剤は各々所定量の活性成分（1種またはそれ以上）を含有する錠剤、舌下錠、カプセル剤、粉末、散剤、顆粒剤もしくは細粒剤として、またはシロップ、エマルジョン若しくは頓服剤のような非水性液中の懸濁液として提供できる。

例えば、顆粒剤は、活性成分（1種またはそれ以上）と1種またはそれ以上の前記担体、酸化防止剤等の補助成分を均一に混合して造粒し、ふるいを用いてメッシュをそろえることにより提供される。錠剤は、活性成分（1種またはそれ以上）を、場合により1種またはそれ以上の補助成分と共に、圧縮または成形により製造できる。カプセル剤は、活性成分（1種またはそれ以上）を、場合により1種またはそれ以上の補助成分と均一に混合した粉末または顆粒を適当なカプセルに充填機等を用いて充填して製造する。直腸投与用の製剤は、カカオ脂などの慣用の担体を使用し、座薬として提供できる。非経腸投与用製剤は、殺菌室素浄化容器中に活性成分（1種またはそれ以上）を乾燥固体として密封して提供できる。この乾燥固体製剤は非経腸投与時に、所定量の無菌水に分散もしくは溶解して患者に投与することができる。

これらの製剤の製造においては、有効成分及び通常の担体の他に前述の酸化防止剤を加えて製剤することが好ましく、又所望により緩衝剤、風味付与剤、表面活性剤、増粘剤、潤滑剤、滑沢剤等から選ばれる1種またはそれ以上の補助成分をさらに含有してもよい。

活性成分、すなわち、式（I）で表される化合物の投与量は投与経路、処置される症状、および処置を受ける患者によって変わることは勿論のことであるが、

最終的には医師の判断にまかせられる。

例えば、適当な投与量は、 $0.1 \sim 50 \text{ mg/kg}$ （体重）／日の範囲にあり、代表的な好適投与量は $0.5 \sim 10 \text{ mg/kg}$ （体重）／日である。

5 所望の投与量は上記の活性成分を1日1回投与してもよいが、1日中の適当な間隔で2～4回分割投与してもよい。

投与期間は、本発明の薬剤が治療すべき症状を観察しながら、医師が適宜定めて良い。スタチン系薬剤、ACE阻害薬、AT1拮抗薬、Ca拮抗薬などのeNOSの増加があるとされる薬剤と併用投与する場合は、それらの薬剤の使用期間とほぼ同じであるが、それより適宜長くするまたは短くすることも本発明の範囲内である。

10 活性成分は単独で、そのまま他の成分と混合せずに投与することもできるが、投与量の調節を容易にするため等の理由から適用疾患に応じた他の活性成分を医薬製剤として投与することもできる。

また、本発明の製剤は、有効成分として式（I）で表される化合物と共に、NOSの基質または補酵素もしくは補因子の、例えばL-アルギニン、フラビン類（例えば、FAD、FMN等）およびカルシウムよりなる群から選ばれる少なくとも1種を補助的有効成分として含有してもよい。これら、有効成分の混合により、式（I）で表される化合物の単独使用に比べて、一層優れた治療効果を期待できる。本発明製剤中における上記各成分の比率は特に限定されないが、例えば、重量で式（I）で表される化合物の1に対して、L-アルギニン、フラビン類およびカルシウムよりなる群から選ばれる少なくとも1種を $0.1 \sim 10$ の範囲、好ましくは $0.5 \sim 2$ の範囲とすることができる。

この混合製剤により、治療する際の適当な投与量は、有効成分の合計量として $0.1 \sim 50 \text{ mg/kg}$ （体重）／日の範囲にあり、好ましくは $0.5 \sim 10 \text{ mg/kg}$ （体重）／日である。

25 治療に当たり、式（I）で表される化合物を単独で有効成分として含む製剤および他の有効成分とともに含む製剤の選択は、年齢、症状等に応じて医師により適宜選択される。

本発明に用いられる活性成分は、（6R）-L-エリスロー5，6，7，8-

テトラヒドロピオプテリン (BH4) およびその塩が最も好ましいが、(6R, S) - 5, 6, 7, 8 - テトラヒドロピオプテリン、1', 2' - ジアセチル - 5, 6, 7, 8 - テトラヒドロピオプテリン、セピアプテリン、6 - メチル - 5, 6, 7, 8 - テトラヒドロプテリン、6 - ヒドロキシメチル - 5, 6, 7, 8 - テトラヒドロプテリンまたは6 - フェニル - 5, 6, 7, 8 - テトラヒドロプテリン
5 およびそれらの塩等の類似化合物でもよい。しかし、生体内に存在する天然体であるBH4が好ましいことは言うまでもない。このBH4・2塩酸塩のラットに対する急性毒性は経口投与で2 g/kg (体重) 以上であり、ほとんど毒性は見
10 い出されない。また、光学活性体でない(6R, S) - 5, 6, 7, 8 - テトラヒドロピオプテリンも、特開昭59-25323号公報におけるパーキンソン病の治療にも見られるように毒性は弱く、本発明の治療に用いられることは可能である。これら以外の式(I)に属する化合物も、急性毒性は殆ど見いだされない。

以下の実施例に従ってさらに詳細に説明するが、本発明は、これらの実施例に限定されるものではない。

15

実 施 例

実施例 1 (顆粒剤、細粒剤)

ポリビニルピロリドン (コリドン30) 1部 (重量部) を滅菌精製水に溶かし、これにアスコルビン酸10部およびL-システイン・塩酸塩5部を加え均一な溶
20 液とした後、BH4・2塩酸塩10部を加え均一とした。

この溶液を賦形剤 (マンニトールまたは乳糖) 59部および崩壊剤 [コーンスターチまたはヒドロキシプロピルセルロース (LH-22)] 15部に加え、練合、造粒、乾燥した後、篩別した。

実施例 2 (錠剤)

25 実施例1で作った活性成分の均一溶液に乳糖58部、微結晶セルロース15部を混合したのち、さらにステアリン酸マグネシウム1部を加え混合し打錠した。

実施例 3 (カプセル剤)

実施例1で作成した剤形のものをカプセルに充填した。但し滑沢剤としてステ

アリン酸マグネシウムを0.2%添加して製剤したものをを用いた。

実施例 4 (注射用剤)

	BH4・2 塩酸塩	1.5 g
	アスコルビン酸	1.5 g
5	L-システイン・塩酸塩	0.5 g
	マンニトール	6.5 g

上記成分を滅菌精製水に溶かし、100mlとし除菌したものを、1ml又は2mlずつバイアル又はアンプルにとり凍結乾燥密封した。

実施例 5 (注射用剤)

- 10 BH4・2 塩酸塩 2.0 gを無酸素で滅菌精製水に溶かし、100mlとした溶液を、除菌し、実施例4と同様に密封した。

実施例 6 (座薬用剤)

	BH4・2 塩酸塩	150 部
	アスコルビン酸	150 部
15	L-システイン・塩酸塩	50 部

上記成分を用い、均一な粉末にしたものをカカオ脂9950部に分散させた。

実施例 7 (顆粒剤)

	BH4・2 塩酸塩	5 部
	アスコルビン酸	5 部
20	L-システイン・塩酸塩	2 部

上記成分を用いて均一な溶液とした。

一方マンニトール55部、ポリビニルピロリドン1部、ヒドロキシプロピルセルロース14部、ならびにL-アルギニンもしくはカルシウム5部を均一に混合したものに上記の溶液を加え、練合、造粒、乾燥した後、篩別した。

25 実施例 8 (顆粒剤)

	BH4・2 塩酸塩	5 部
	アスコルビン酸	5 部
	L-システイン・塩酸塩	5 部

マンニトール 5 2 部

ポリビニルピロリドン（コリドン 3 0） 1 部

ヒドロキシプロピルセルロース（LH-2 2）

1 2 部

5 L-アルギニンまたはカルシウム 1 0 部

上記成分を用い実施例 7 と同様に造粒し、篩別した。

実施例 9 （顆粒剤）

BH 4 ・ 2 塩酸塩 5 部

アスコルビン酸 5 部

10 L-システイン・塩酸塩 2 部

上記成分を使用し均一溶液とした。

一方、L-アルギニンまたはカルシウム 1 0 部、マンニトール 5 0 部、ポリビニルピロリドン（コリドン 3 0） 1 部およびヒドロキシプロピルセルロース（LH-2 2） 9 部を均一に混合したものに上記溶液を練合、造粒、乾燥した後、篩

15 別した。

実施例 1 0 eNOS 発現の確認

eNOS トランスジェニックマウスと ApoE 欠損マウス（ApoE-KO ホモ接合体）を交配し、eNOS を過剰発現する eNOS トランスジェニック ApoE 欠損マウス（ApoE-KO/eNOS-Tg）を作成した（米国心臓病会議 2001 年 11 月 16 日、抄録 No.1312）。

20 eNOS トランスジェニック ApoE 欠損マウスは遺伝子増幅検査法（PCR 法）により eNOS 遺伝子を増幅させその量を測定することで選別できる。12 週齢の ApoE-KO/eNOS-Tg マウスの大動脈より蛋白質を抽出し、免疫ブロット法を用いて eNOS の発現量をデンシトメーターで測定した。結果を図 1 に示す。図中、WT、eNOS-Tg、ApoE-KO、および ApoE-KO/eNOS-Tg は、それぞれ、野生型、eNOS トランスジェニック、ApoE 欠損、および eNOS トランスジェニック ApoE 欠損マウスを意味する。グラフは 6 回の独立した実験の平均値±標準偏差を示す。星印は WT に対して $p<0.01$ 、十字記号は WT に対して $p<0.05$ 、縦の複十字記号は ApoE-KO に対して $p<0.05$ であることを示す。

トランスジェニックマウスは、野生型マウスと比較して明らかに eNOS 蛋白量が高く、eNOS を過剰に発現することが示された。

実施例 1 1 大動脈洞の粥腫部位領域(1)

実施例 1 0 で作成したマウス (ApoE-KO/eNOS-Tg) 3 7 匹を 4 週齢で離乳し、
5 高コレステロール食 (1.25% コレステロール、7.5% ココアバター、7.5% カゼイン、0.5% コール酸ナトリウム) で 12 週間飼育した。

16 週齢マウスをペントバルビタール処理し、大動脈を 10U/ml のヘパリンを含む生理食塩水で環流した。その後大動脈を左心室中部から腸骨大動脈分枝部位までの間を切り出し、4% paraformaldehyde で一晩固定した。Excised aorta の遠
10 位部 (大動脈弓から腸骨大動脈分枝まで) から周辺の組織を取り除いたのち、縦断的に開放し、シリコンコートした dish に留め、Sudan III で染色した。そしてその光顕画像を NIH 1.61 Imaging Software を用いて画像解析した。粥腫形成部位は lesion area /total area of aorta で表した。結果を図 2 に示す。*は ApoE-KO の雄に対して $p < 0.0001$ 、十字記号は ApoE-KO の雌に対して $p < 0.001$ であることを示す。
15

eNOS トランスジェニック ApoE-KO マウスにおいて粥腫部位が拡大し、動脈硬化が促進されることが明らかとなった。

実施例 1 2 大動脈洞の粥状硬化部位領域(2)

実施例 1 0 で作成したマウス (ApoE-KO/eNOS-Tg) を各群 6 ~ 8 匹用い、BH4
20 非投与群には高コレステロール食 (実施例 1 0 参照) を、BH4 投与群には高コレステロール食に 10mg/kg/day の BH4 を添加し、実施例 1 1 と同じ実験を行い、大動脈を切り出し画像解析により測定した。結果を図 3 に示す。*は BH4 を投与されていない雄 ApoE-KO/eNOS-Tg マウスに対して $p < 0.05$ 、十字記号は BH4 を投与されていない雌 ApoE-KO/eNOS-Tg マウスに対して $p < 0.01$ であることを示す。

25 BH4 投与群では ApoE-KO/eNOS-Tg マウスにおいて粥腫部位が縮小し、動脈効果が抑制された。

実施例 1 3 スーパーオキシド産生

実施例 1 2 と同様にして、BH4 添加及び無添加の高コレステロール食で 8 週間

飼育した、各群 6 ～ 8 匹の 12 週齢のマウス (ApoE-KO/eNOS-Tg) から大動脈を取り出し、周辺の組織を取り除いた後、pH7.4 の PBS を満たした黒色のシリコン dish 上に mount した。サンプルを外部の光の干渉を避けるため遮光した箱の中に置いた後、最終濃度が $20 \mu\text{m/L}$ となるように MCLA をチャンバーに添加した。

- 5 そして MCLA (2-methyl-6-(4-methoxyphenyl)-3,7-dihydroimidazol[1,2-a]pyrazin-3-one-hydrochloride) とスーパーオキシドアニオンが反応することで発する Light emission を 5 分間測定することを 3 回繰り返した。

- Light emission データはコンピュータに保存し、得られた非線形のグレースケールの画像は pseudocolor に変換した。スーパーオキシドによる化学発光 (chemiluminescence) 強度は WinLigh32 ソフトウェアを用いて解析した。粥腫部位は Sudan III 染色で染まった部位と定義した。それぞれのマウスから粥腫部位、粥腫のない部位それぞれ約 10 箇所 ($0.0012\text{--}0.002\text{cm}^2$) をランダムに選択し測定した。バックグラウンドレベルは各 Chemiluminescent signal intensity から差し引いた。図 4 に野生型マウスの測定値を 1.0 として計算した結果を相対値で示す。グラフは各群 6 から 10 匹の平均±標準偏差を示す。*は BH4 を投与されていない ApoE-KO/eNOS-Tg マウスに対して $p<0.01$ であることを示す。

- BH4 投与群では、高コレステロール食で飼育した ApoE-KO/eNOS-Tg マウスにおいて plaque 部位のスーパーオキシド産生が有意に減少し、BH4 によるスーパーオキシド抑制作用が示された。

実施例 14 NO 産生

- 8 週間高コレステロール食で飼育した 12 週齢のマウス (ApoE-KO/eNOS-Tg) から、大動脈弓から腸骨大動脈分枝までを含む大動脈を取り出した後すぐに pH7.4 の PBS 中で周辺の組織を取り除いた。試料を 1.5mmol/L 塩化カルシウムを含むリン酸バッファ (pH7.4) を満たした黒色の dish に留め、外部光線の干渉を避けるため遮光した箱の中に置いた。Diaminofluorescein-2 diacetate (DAF-2 DA) を最終濃度 $10 \mu\text{mol/L}$ となるように添加し、試料を常温で 5 分間放置した後、485nm の青光で励起した。DAF-2 DA と NO の反応により試料より発せられた蛍光

を、中心が 532nm の帯域フィルターを装着した luminograph により感知させ、その 515nm 波長の強度で 1 秒間測定した。大動脈内皮からの NO 産生を求めるために、試料を $1\mu\text{mol/L}$ のアセチルコリン溶液に 5 分間放置し、蛍光画像を測定した。各実験ののち、測定された試料が粥腫部位か粥腫のない部分か区別するため Sudan III で染色し観察した。測定データはコンピュータに取り込み、NO 産生は NightOWL-imaging system より提供された WinLight32 ソフトウェアを用い、粥腫のない部分について解析を行った。非特異的な発光や大動脈のコラーゲン繊維の反射を排除するため、DAF 反応後の測定からバックグラウンドの測定値を差し引いた。少なくとも 10 箇所の粥腫部分を含まない部位 ($0.0005\text{--}0.001\text{cm}^2$) をランダムに選択し、NO と反応して発せられた蛍光を測定した。NO 産生量は $\text{picowatt}/\text{cm}^2$ で示した。内皮からの NO 産生はアセチルコリン溶液放置後の測定値からアセチルコリン溶液に放置しない条件での測定値を差し引いて求めた。結果を図 5 に示す。グラフは 6 回の独立した実験の平均±標準偏差を示す。*は BH4 を投与されていない ApoE-KO/eNOS-Tg マウスに対して $p<0.01$ であることを示す。

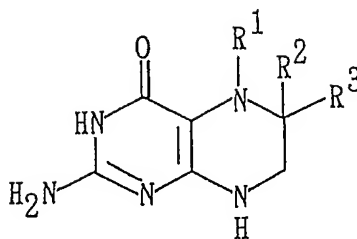
ApoE-KO/eNOS-Tg マウスにおいて、解析部分（粥腫のない部分）では NO 産生が有意に増加し、BH4 による NO 産生促進作用が示された。

発明の効果

本発明によれば eNOS の増加により eNOS が本来の機能を発揮していない状態または、eNOS 遺伝子が過剰発現した状態、またはそのような状態に起因する種々の疾患に対し、有効な予防または治療剤が提供される。

請 求 の 範 囲

1. 次式 (I) :



[式中、 R^1 および R^2 は、それぞれ水素原子を表すか、または一緒になって単結合を表し、 R^1 および R^2 が水素原子を表す場合には、 R^3 は $-\text{CH}(\text{OH})\text{CH}(\text{OH})\text{CH}_3$ 、 $-\text{CH}(\text{OCOCH}_3)\text{CH}(\text{OCOCH}_3)\text{CH}_3$ 、 $-\text{CH}_3$ 、 $-\text{CH}_2\text{OH}$ 又はフェニル基を表し、 R^1 および R^2 が一緒になって単結合を表す場合には、 R^3 は $-\text{COCH}(\text{OH})\text{CH}_3$ を表す] で表される化合物又はその薬学的に許容される塩を有効成分とする、内皮型 NO 合成酵素 (eNOS) の増加に起因する疾患・病態の予防または治療剤。

2. eNOS 増加に起因する疾患・病態が、心血管系の疾患である、請求項 1 に記載の予防または治療剤。

3. eNOS 増加に起因する疾患・病態が、動脈硬化である、請求項 1 に記載の予防または治療剤。

4. 請求項 1 に記載の化合物又はその薬学的に許容される塩を有効成分とする、eNOS 増加に起因する疾患・病態の悪化の予防または治療剤。

5. eNOS 増加に起因する疾患・病態の悪化が、心血管系の疾患である、請求項 4 に記載の予防または治療剤。

6. eNOS 増加に起因する疾患・病態の悪化が、動脈硬化である、請求項 4 に記載の予防または治療剤。

7. 請求項 1 に記載の化合物又はその薬学的に許容される塩を有効成分とする、eNOS 増加による疾患・病態の治療効果を促進する治療剤。

8. eNOS 増加による疾患・病態の治療効果が心血管系の疾患に対してである、請求項 7 に記載の治療剤。

9. eNOS 増加に起因する疾患・病態の治療効果が、動脈硬化に対してである、請求項 7 に記載の治療剤。

10. R^3 が L-エリスロ-CH(OH)CH(OH)CH₃ である、請求項 1 から 9 のいずれか 1 項に記載の予防または治療剤。

5 11. eNOS 増加が eNOS 遺伝子発現の増加によるものである請求項 1 から 10 のいずれか 1 項に記載の予防または治療剤。

12. eNOS 増加が eNOS 遺伝子導入に伴うものである請求項 1 から 11 のいずれか 1 項に記載の予防または治療剤。

10 13. eNOS 増加が eNOS 増加を促す医薬品の投与によるものである請求項 1 から 11 のいずれか 1 項に記載の予防または治療剤。

14. eNOS 増加を促す医薬品がさらに配合されている請求項 1 から 11 のいずれか 1 項に記載の予防または治療剤。

図 1

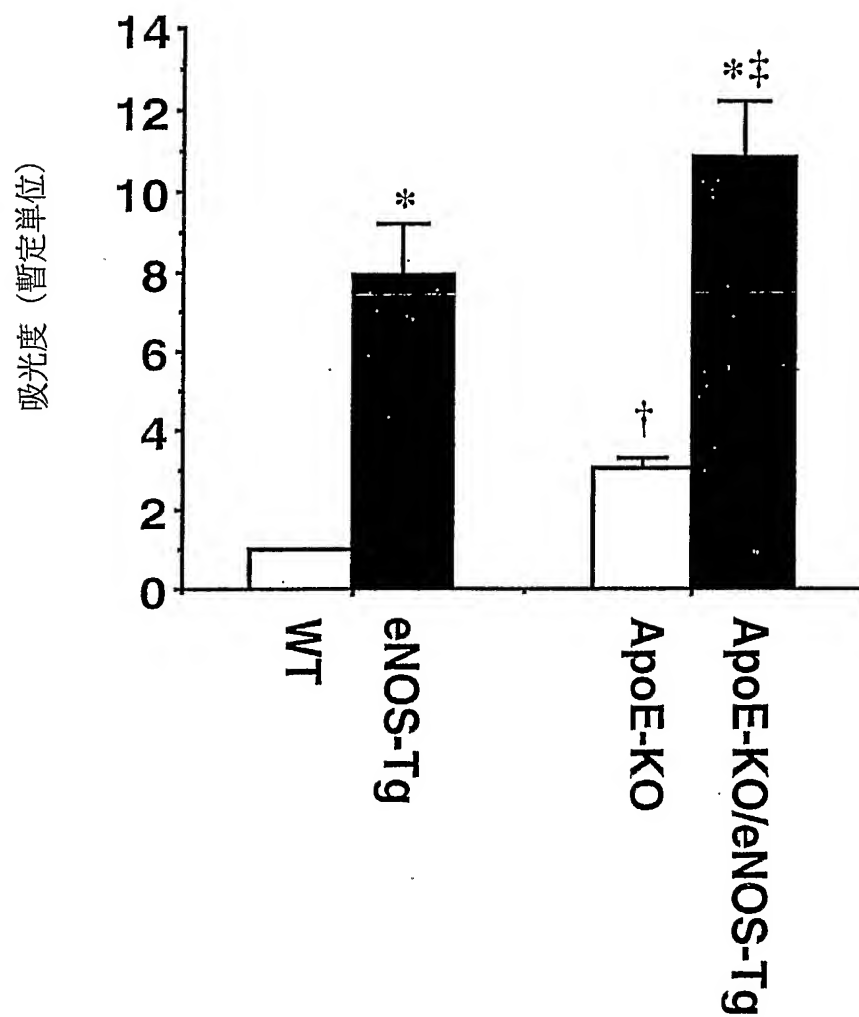


図 2

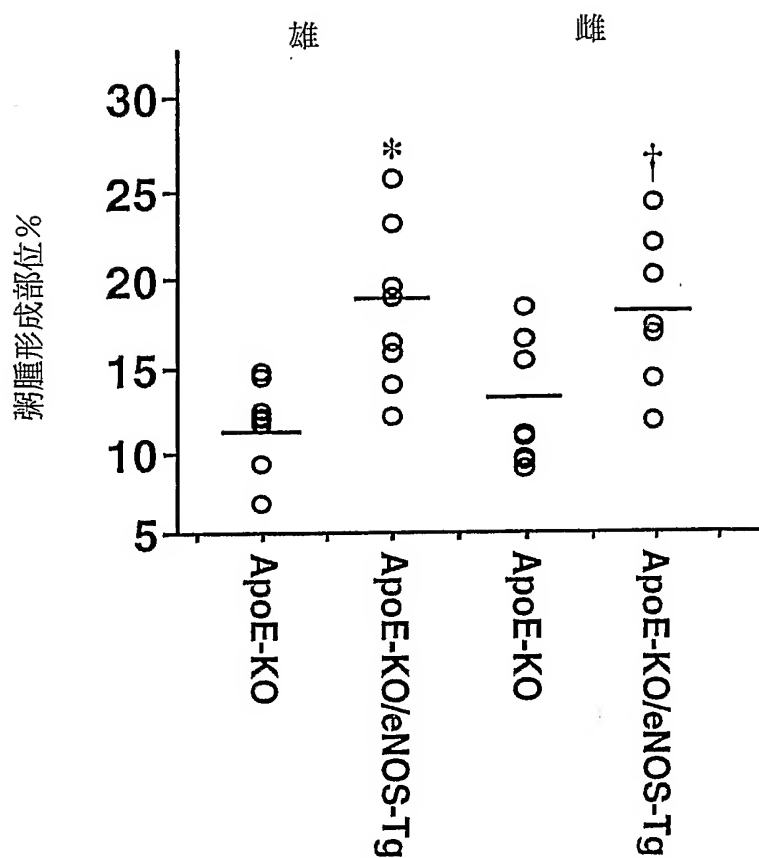


図 3

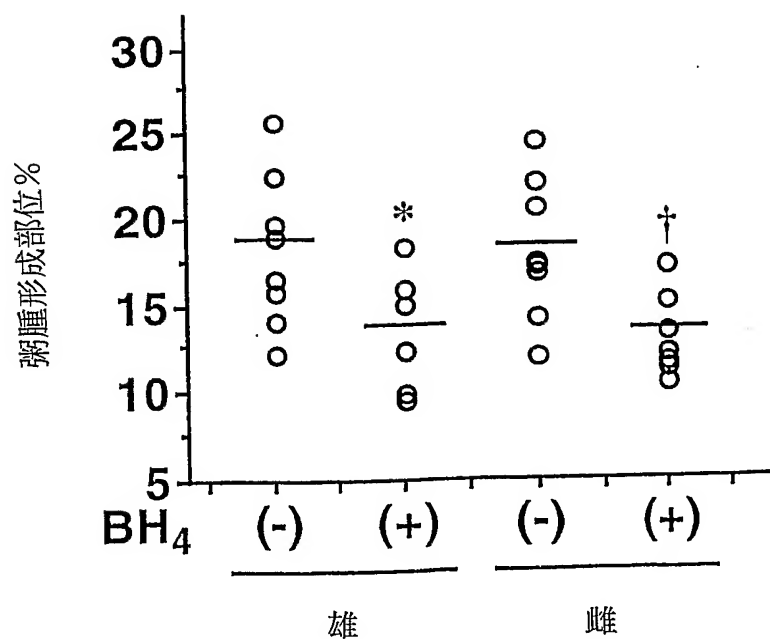


図 4

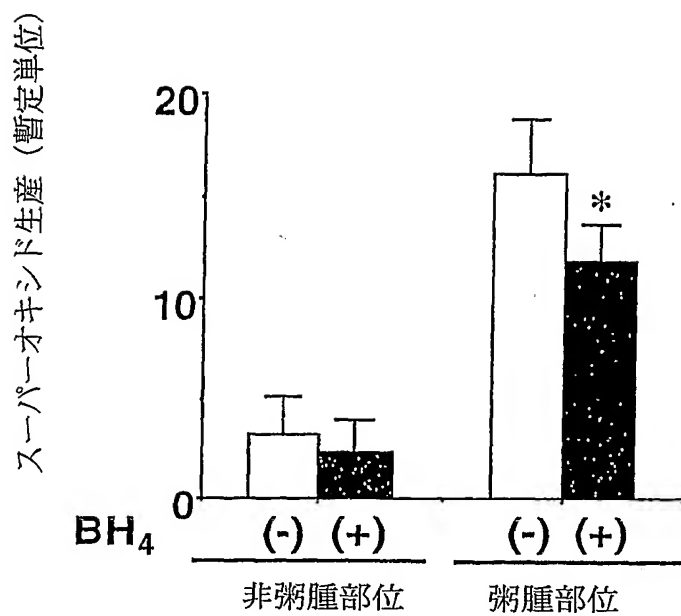
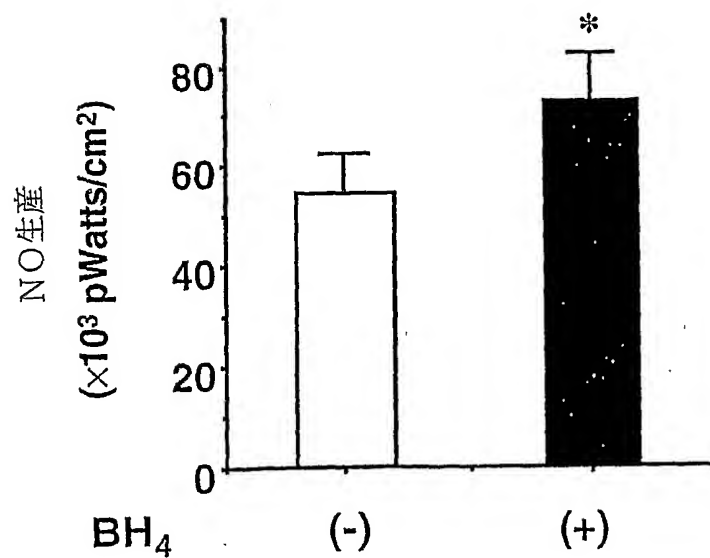


図 5



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP03/03428

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER Int.Cl ⁷ A61K31/519, A61P9/00, 9/12, 43/00//C07D475/04		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) Int.Cl ⁷ A61K31/519, A61P9/00, 9/12, 43/00, C07D475/04		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) REGISTRY (STN), CAPLUS (STN), MEDLINE (STN), EMBASE (STN)		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	EP 908182 A1 (SUNTORY LTD.), 14 April, 1999 (14.04.99), Full text & JP 10-338637 A & WO 98/08516 A1	1-14
X	SHELDON MILSTIEN et al., Oxidation of Tetrahydrobiopterin by Peroxynitrite: Implications for Vascular Endothelial Function, Biochemical and Biophysical Research Communications, 1999, Vol.263, pages 681 to 684, full text	1-14
Y	ROBERT M. F. WEVER et al., Tetrahydrobiopterin Regulates Superoxide and Nitric Oxide Generation by Recombinant Endothelial Nitric Oxide Synthase, Biochemical and Biophysical Research Communications, 1997, Vol.237, pages 340 to 344, full text	1-14
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/> See patent family annex.		
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier document but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed		"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family
Date of the actual completion of the international search 10 June, 2003 (10.06.03)		Date of mailing of the international search report 24 June, 2003 (24.06.03)
Name and mailing address of the ISA/ Japanese Patent Office		Authorized officer
Facsimile No.		Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP03/03428

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
P,X	Yoshiyuki RIKITAKE et al., "NO Gosei Sokushin'yaku", Experimental Medicine, 25 May, 2002 (25.05.02), Vol.20, No.8, pages 1250 to 1255, full text	1-14

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl⁷ A61K31/519, A61P9/00, 9/10, 9/12, 43/00
//C07D475/04

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl⁷ A61K31/519, A61P9/00, 9/10, 9/12, 43/00,
C07D475/04

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

REGISTRY (STN), CAPLUS (STN), MEDLINE (STN), EMBASE (STN),
JICST (JOIS)

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
X	EP 908182 A1 (SUNTORY LIMITED) 1999.04.14 全文 & JP 10-338637 A & WO 98/08516 A1	1-14
Y	SHELDON MILSTIEN, et al., Oxidation of Tetrahydrobiopterin by Peroxynitrite: Implications for Vascular Endothelial Function, Biochemical and Biophysical Research Communications, 1999, Vol. 263, p. 681-684 全文	1-14

☒ C欄の続きにも文献が列挙されている。☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

- 「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの
「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの
「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)
「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献
「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

- 「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの
「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの
「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの
「&」 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

10.06.03

国際調査報告の発送日

24.06.03

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/JP)

郵便番号 100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

中木 亜希



4 P

9282

電話番号 03-3581-1101 内線 3492

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
Y	ROBERT M.F. WEVER, et al., Tetrahydrobiopterin Regulates Superoxide and Nitric Oxide Generation by Recombinant Endothelial Nitric Oxide Synthase, Biochemical and Biophysical Research Communications, 1997, Vol. 237, p. 340-344 全文	1 - 1 4
P X	力武良行ら、NO合成促進薬、実験医学、2002. 05. 25, Vol. 20, No. 8, p. 1250-1255 全文	1 - 1 4